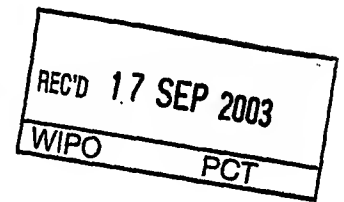


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 36 461.3

Anmeldetag: 8. August 2002

Anmelder/Inhaber: Siemens Aktiengesellschaft, München/DE

Bezeichnung: Radikalisch vernetzbares Hydrogel mit Linkergruppen

IPC: C 08 L, C 08 J

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Sl

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Stremme



Beschreibung

Radikalisch vernetzbares Hydrogel mit Linkergruppen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft radikalisch vernetzbare
liquide Zusammensetzungen zur Erzeugung von Hydrogelen auf
Basis von Polyacrylamid.

- 10 In der modernen biologischen Analysentechnik sowie in der me-
dizinischen Diagnostik werden in zunehmenden Maße sogenannte
Biochips eingesetzt. Biochips sind meist planare Trägersy-
steme aus Glas oder Kunststoff, deren Oberfläche mit einer
zweidimensionalen Erkennungsschicht, welche biologische Er-
kennungsmoleküle umfasst, ausgerüstet sind. Ein bekanntes
15 Beispiel für einen derartigen Biochip ist der optisch ausles-
bare DNA-Chip, welcher von F. Hänel, H.P. Saluz in BIOforum
9/99, Seiten 504-507 beschrieben ist.

- 20 Zur Steigerung der Empfindlichkeit derartiger Biochips sowie
zur Optimierung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse ist
der Einsatz dreidimensionaler Immobilisierungsschichten für
die biologischen Erkennungsmoleküle sinnvoll. So verwendet
die Firma Schleicher & Schuell GmbH eine dreidimensionale Im-
mobilisierungsschicht für ein Produkt mit dem Namen FAST™
25 Slides DNA-Chips, in denen Fänger-Oligos in einer dreidimen-
sionalen Nitrocellulose-Membran immobilisiert sind (Schlei-
cher & Schuell, BioMolecular Screening, Catalog 2001 (int.
Edt.)).

- 30 Ein Problem bei der technischen Realisierung entsprechender
Immobilisierungsschichten ist zunächst der Wunsch nach einer
kostengünstigen Methode zum Aufbringen der Schichten auf die
Chips oder auf Transducersysteme. Günstigerweise werden die
Immobilisierungssysteme aus flüssigen Vorstufen auf eine ge-
35 eignete Unterlage aufgetropft, darauf dispensiert, aufge-
schleudert oder aufgedruckt. Zum Verfestigen der Schichten
werden zum Beispiel thermische Polymerisation bzw. Vernet-

zung, Trocknungsvorgänge oder fotochemische Polymerisierungs- bzw. Vernetzungsvorgänge gewählt.

Ph. Arquint beschreibt für eine solche Anwendung ein photo-
 5 vernetztes Hydrogel auf Basis eines vernetzten Polyacrylamids
 ("Integrated Blood Gas Sensor for pO₂, pCO₂ und pH based on
 Silicon Technology (Dissertation, Ph. Arquint, Uni Neuchatel,
 Schweiz, 1994).

10 Hydrogele spielen eine bedeutende Rolle in der chemischen
 und/oder biochemischen Analytik sowie insbesondere bei der
 Realisierung von Chemo- und Biosensoren. Sie dienen dazu,
 ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form bei
 15 gleichzeitiger Gewährleistung des Stoffaustausches in einer
 überwiegend wässrigen Umgebung zu realisieren. Durch Wahl
 der chemischen Zusammensetzung, was die Komponenten und de-
 ren Verhältnis untereinander anbetrifft, können die Eigen-
 schaften der Hydrogele, wie Wassergehalt, Quellverhalten,
 mechanische Stabilität, etc. über weite Bereiche variiert
 20 werden.

Ph. Arquint beschreibt in seiner Dissertation eine Methode,
 bei welcher Poly-Acrylamid-Hydrogele mit Hilfe einer annä-
 hernd halbleiterkompatiblen Methode auf Silicium-Wafern auf-
 25 gebracht und fototechnisch strukturiert werden. Bei der be-
 schriebenen Technologie liegt jedoch ein entscheidendes Pro-
 blem vor:

Ein Nachteil des von Arquint beschriebenen Systemes, d.h. der
 30 Hydrogel-Vorstufe, ist darin zu sehen, dass in der vernetzten
 Schicht keine reaktiven Linkergruppen zur Verfügung stehen,
 mit deren Hilfe chemische oder biologische Erkennungsmoleküle
 für analytische Anwendungen eingekoppelt werden.

35 Timofeev et al. beschreiben in Nucleic Acids Research,
 1966, Band 24, Nr. 16, Seiten 3142-3148 ein chemisch modi-
 fiziertes radikalisch vernetztes Polyacrylamid, dass u.a.

für die Immobilisierung von Fänger-Oligos eingesetzt werden kann. Als Kopplungsgruppen im Hydrogel werden Amino- oder Aldehyd-Gruppen verwendet. Aldehyd- bzw. Amino- funktionalisierte Fänger-Oligos können an diese Kopplungsgruppen unter reduktiven Reaktionsbedingungen kovalent immobilisiert werden. Das bedeutet, dass neben der eigentlichen Kopplungsreaktion zwischen Amino- und Aldehydgruppe bzw. umgekehrt ein zusätzlicher Reduktionsschritt unter Einsatz von Reduktionsmitteln erforderlich ist. Weitere von Timofeev et al. beschriebene Methoden zur chemischen Aktivierung des vernetzten Polyacrylamids erfordern ebenfalls zusätzliche Reaktionsschritte in der Polymermatrix.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung eines radikalisch vernetzbaren Hydrogelsystems auf Acrylamidbasis, das ein Comonomer enthält, das die kovalente Ankopplung entsprechend modifizierter Biomoleküle, d.h. chemischer oder biologischer Erkennungsmoleküle, mit kompatiblen Linkergruppen, über eine reaktive Linkergruppe in einem einfachen, schnellen Reaktionsschritt ohne zusätzlichen Chemikalieneinsatz möglich macht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge eine radikalisch vernetzbare, liquide Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht auf Basis von Polyacrylamid, die sich dadurch auszeichnen, dass die Zusammensetzung neben der Monomervorstufe des Polyacrylamids, dem Vernetzungsmittel und dem/den Radikalinitiator(en), wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls wenigstens einen Weichmacher umfasst.

Nach Schichtherstellung und thermischer bzw. Fotovernetzung wird ein mit Wasser quellbares Hydrogel erhalten, das reaktive Linkergruppen zur Immobilisierung chemischer oder biologischer Erkennungsmoleküle für analytische oder diagnostische Anwendungen enthält.

Die Monomervorstufe des Polyacrylamids basiert auf Acrylamid und Methylenbisacrylamid, wodurch wie bei Arquint zwei Monomerketten miteinander verbunden sind. Durch Variation der Konzentration des Vernetzungsmittels Methylenbisacrylamid, Dimethylacrylsäureester, wie zum Beispiel Tetraethylenglycoldimethacrylat, lässt sich die Maschenweite des Hydrogeles leicht einstellen.

Vorzugsweise ist das Comonomer mit reaktiven Linkergruppen aus der Gruppe ausgewählt, die aus Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat besteht. Der Weichmacher ist vorzugsweise Mono-, Di- und/oder Triethylenglykol. Durch Optimierung des Weichmacheranteiles in der Zusammensetzung kann die getrocknete Vorstufenschicht in ihrem Polymerisierungsverhalten optimiert werden.

Die Zusammensetzung liegt vorzugsweise in einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid vor. Durch Variation des Lösungsmittelanteils kann die Verarbeitungsviskosität leicht eingestellt werden.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung bietet für die Erzeugung von Hydrogelen, insbesondere solcher, welche zur Herstellung von Immobilisierungsschichten Verwendung finden sollen, viele Vorteile. Die Vorstufenkomponenten sind in einem breit variierbaren Mischungsverhältnis mischbar. Die Viskosität der Zusammensetzung ist leicht einstellbar. Eine gute Schichtbildung ist gewährleistet, während welcher keine Phasentrennung auftritt. Die Schicht ist für Licht zur Fotoinitiation ausreichend transparent. Vernetzungsdichte und Wasserquellbarkeit lassen sich beliebig einstellen. Die Hilfskomponenten, wie Weichmacher etc., können nach der Vernetzung leicht ausgewaschen werden. Die Haftung an der Substratoberfläche kann mittels üblicher Haftvermittlersysteme auf beispielsweise Silanbasis verstärkt werden.

Patentansprüche

1. Radikalisch vernetzbare liquide Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht auf Basis von Polyacrylamid, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung neben der Monomer-Vorstufe des Polyacrylamids, dem Vernetzungsmittel und den/dem Radikalinitiator(en), wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls wenigstens einen Weichmacher umfasst.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Monomer-Vorstufe des Polyacrylamids auf Acrylamid Methylenbis(meth)acrylamid und/oder Dimethacryl-säureester basiert.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Comonomer mit reaktiven Linkergruppen aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat besteht.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Weichmacher aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Mono-, Di- und/oder Triethylenglycol besteht.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie in einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel vorliegt.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel Dimethylformamid ist.
7. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Erzeugung einer Immobilisierungsschicht für Biomoleküle auf einer Transduceroberfläche.

Zusammenfassung

Radikalisch vernetzbares Hydrogel mit Linkergruppen

- 5 Radikalisch vernetzbare liquide Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht auf Basis von Polyacrylamid, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung neben der Monomer-Vorstufe des Polyacrylamids, dem Vernetzungsmittel und den/dem Radikalinitiator(en), wenigstens ein Comonomer mit
- 10 reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls wenigstens einen Weichmacher umfasst.